

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C08H 1/06, A61L 15/00, 27/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/13731 (43) Date de publication internationale: 23 juin 1994 (23.06.94)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01258</p> <p>(22) Date de dépôt international: 16 décembre 1993 (16.12.93)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 92/15429 16 décembre 1992 (16.12.92) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33, avenue du Docteur Georges-Lévy, Parc-Chub du Moulin-à-vent, F-69693 Vénissieux Cédex (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GAGNIEU, Christian [FR/FR]; 19, rue Pierre-et-Marie-Curie, F-69100 Chassieu (FR). NICOLAS, Florence [FR/FR]; 33, rue François-de-Pressencé, F-69100 Villeurbanne (FR). SOULA, Gérard [FR/FR]; 33, rue Nungesser, F-69330 Meyzieu (FR).</p> <p>(74) Mandataire: ROPITAL-BONVARLET, Claude; Cabinet Beau de Loménie, 51, avenue Jean-Jaurès, B.P. 7073, F-69341 Lyon Cédex 07 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
(54) Title: NEW COLLAGEN DERIVATIVES, PRODUCTION PROCESS AND APPLICATION TO THE PREPARATION OF BIOMATERIALS		
(54) Titre: DERIVES DE COLLAGENE, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LEUR APPLICATION A LA PREPARATION DE BIOMATERIAUX		
(57) Abstract		
<p>The present invention relates to a modified collagen, which is soluble in water and/or in aprotic polar organic solvents and which comprises free or substituted thiol functions carried by cystein rests or derivatives thereof, said rests being at least partially rests which are directly grafted to the collagenic chain, the collagen being characterized in that it has a ratio of free or substituted thiols functions higher than 0.3, preferably higher than 0.5 mM/g of collagen. The invention also relates to the production of said new collagen derivatives and to their application to the preparation of biomaterials, the latter being particularly usable for the fabrication of implants, prostheses or the like.</p>		
(57) Abrégé		
<p>La présente invention concerne un collagène modifié, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques et comprenant des fonctions thioles libres ou substituées, portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés, lesdits résidus étant, au moins pour partie, des résidus greffés directement sur la chaîne collagénique, caractérisé en ce qu'il possède un taux de fonctions thioles, libres ou substituées, supérieur à 0,3, de préférence à 0,5 mM/g de collagène. L'invention a également trait à l'obtention de ces nouveaux dérivés de collagène et à leur application à la préparation de biomatériaux, ces derniers pouvant, notamment, être utilisés dans la fabrication d'implants, de prothèses ou analogues.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldovie	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

DERIVES DE COLLAGENE, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LEUR APPLICATION A LA PREPARATION DE BIOMATERIAUX

5 **DOMAINE TECHNIQUE :**

La présente invention est relative à de nouveaux dérivés de collagène, en particulier réticulables et susceptibles d'être utilisés, notamment, dans la préparation de biomatériaux, à partir desquels des produits, applicables notamment
10 en médecine et plus particulièrement en chirurgie ou en cosmétique, peuvent être obtenus.

Parmi ces produits, on peut citer les tissus ou les organes artificiels, tels que la peau artificielle, les prothèses ou implants osseux, ligamentaires, cardio-vasculaires, intra-oculaires, etc, ou bien encore, les systèmes de bioencapsulation
15 (implants, microsphères, microcapsules) permettant la libération contrôlée de principes actifs in vivo.

A titre d'exemple, on peut également évoquer les accessoires médicaux, tels que les fils de sutures ou les revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables.

20 L'invention concerne, également, des procédés d'obtention de ces nouveaux dérivés de collagène, ainsi que de nouveaux produits intermédiaires intervenant dans le susdit procédé et, enfin, le collagène réticulé issu du collagène réticulable figurant parmi les nouveaux dérivés de collagène conformes à l'invention.

Le domaine de l'invention est celui des matériaux biocompatibles à base
25 de collagène, utiles comme matière première pour la réalisation d'articles destinés à être mis en contact avec ou implantés dans le corps humain ou animal et capables de s'assimiler au mieux aux matériaux biologiques, notamment sur le plan mécanique, de manière à pouvoir les remplacer.

Le collagène est une protéine connue, présente à tous les niveaux de
30 l'organisation des tissus conjonctifs : il s'agit de la principale protéine de la peau et du tissu conjonctif. Par nature, il possède des caractéristiques biochimiques et

physico-chimiques relativement bien adaptées pour des utilisations en tant que biomatériaux.

Au sens de la présente invention, le terme collagène désigne tout peptide de nature collagénique, tel que le collagène, le collagène dénaturé et la gélatine.

5

ART ANTERIEUR :

Différentes qualités de collagène d'origine animale ou humaine sont actuellement commercialisées dans le monde, essentiellement pour l'élaboration de biomatériaux ou de produits cosmétiques.

10

Dans les applications répandues à l'heure actuelle, on se satisfait des propriétés des différentes qualités disponibles.

15

Ainsi, parmi ces collagènes on trouve d'excellents supports d'adhésion, de multiplication et de croissance cellulaire, appréciés pour la réalisation de milieux de culture cellulaire.

On tire également profit de leur hydrophilie, de leur faible immunogénicité, de leur bonne résistance à la protéolyse et de leur caractère hémostatique.

20

Les propriétés mécaniques des collagènes natifs sont acceptables pour un certain nombre d'utilisations.

Cependant, force est de reconnaître que, dans le domaine des articles médicaux implantables, tels que les implants et les prothèses, les collagènes natifs du marché souffrent d'importantes lacunes quant à leur résistance mécanique et à leur résistance à la protéolyse.

25

En effet, l'introduction de ces corps étrangers, que constituent les implants et les prothèses, dans un organisme vivant induit des phénomènes de rejet qui se traduisent, notamment, par des réactions inflammatoires provoquant, entre autre, la production de collagénase, qui hydrolyse le collagène. Il en résulte, pour le moins, une altération du comportement mécanique du greffon à base de collagène.

30

On sait que la réticulation permet d'améliorer les propriétés mécaniques du collagène. Elle confère aux fibres de collagène une très grande résistance à la

traction, à la déchirure et à la dégradation enzymatique, grâce aux nombreuses liaisons covalentes qu'elle crée entre les chaînes de collagène.

Sur la base de cette connaissance scientifique, de nombreuses études ont été entreprises pour développer les possibilités de réticulation artificielle du collagène.

Il est ainsi apparu trois grands types de techniques de réticulation de cette protéine.

Le premier type de technique est la réticulation à l'aide d'agent pontant dans laquelle des molécules exogènes, le plus souvent bifonctionnelles, réagissent pour permettre l'établissement des liaisons. Les réactifs les plus fréquemment employés sont :

- Les mono- et di-aldéhydes, tels que le formaldéhyde (engendrant des ponts méthylènes), le malonaldéhyde et, surtout, le glutaraldéhyde (réticulant par liaisons imines et aldols). Les principaux problèmes sont dus à leurs extrémités - CHO qui sont irritantes et à l'autopolymérisation des di-aldéhydes qui produit des polymères cytotoxiques.
- Les composés dicarboxyliques. Ils sont, à ce jour, essentiellement employés, soit pour modifier le collagène, soit pour le tannage des peaux. Ils réagissent par formation de liaisons amides, voire esters.
- Les diamines, telles que l'hexaméthylène diamine, qui agissent uniquement par liaisons amides.
- Les diisocyanates, dont l'hexaméthylène diisocyanate qui est utilisé pour la réticulation par liaisons amides.
- Les disulfonyl-chlorures qui établissent des liaisons intra et inter-caténaires.

Suivant un second type de technique, on procède à la création d'un réseau par liaison covalente entre les molécules de collagène, et ce sans greffage de composés exogènes.

Les principales méthodes employées sont :

- L'irradiation (rayonnement ultra-violet ou gamma) qui produit, à la fois, un certain nombre de désaminations oxydatives permettant des réticulations par liaisons imines et aldols, ainsi que des radicaux libres très réactifs pouvant créer

des pontages covalents. Une telle méthode présente l'inconvénient de provoquer la réticulation du collagène uniquement dans une gamme étroite de basses énergies. Pour des énergies supérieures, elle entraîne des hydrolyses ou des dénaturations très préjudiciables au produit.

- 5 - La déshydratation poussée (plus de 100° C sous vide) qui conduit à la formation de liaisons amides et esters, ainsi que de lysino-alanines intra et intermoléculaires. Parmi les réactifs employés, on peut citer les carbodiimides, tels que le cyanamide ou le dicyclohexylcarbodiimide. Ce mode de réticulation en est encore au stade expérimental.
- 10 - La réticulation enzymatique par des protéines mimant l'effet de lysyloxydase (enzyme responsable de la réticulation naturelle). Cela reste, pour le moment, à l'étude.
- L'oxydo-réduction qui induit une désamination oxydative des extrémités aminées qui deviennent aldéhydiques. On utilise, essentiellement, des cations métalliques
15 (Cu²⁺, Fe²⁺, Al³⁺) associés à des cofacteurs (Ascorbate, Pyridoxal - 5P), ainsi que des sulfites ou des nitrites. Cette méthode est très utilisée pour le tannage du cuir.
- L'activation fonctionnelle, en particulier des carboxyles qui peuvent fournir des azides d'acides ayant une réactivité très sélective vis-à-vis des extrémités - NH₂
20 et conduisant à la formation d'une liaison amide. Divers biomatériaux peuvent ainsi être réalisés.

Le troisième type de technique est la réticulation par copolymérisation. Elle consiste à réunir, par des liaisons covalentes, le collagène à un autre polymère pour donner des conformations plus ou moins enchevêtrées. Les polymères le plus
25 souvent associés au collagène sont :

- Les dérivés d'acrylique, dont la toxicité est souvent rédhibitoire pour les applications en médecine humaine, du type implant.
- Les mélanges acrylonitrile-styrène avec lesquels il n'a jusqu'alors pas été possible de dépasser le stade du laboratoire.
- 30 - Les polyuréthanes surtout utilisés dans le renforcement des cuirs tannés.
- Les polyalcools.

- Les silicones.

Les liaisons impliquées dans la copolymérisation sont très diverses et dépendent des groupements mis en jeu par chaque polymère.

Toutes ces techniques, qu'elles soient de nature physique ou chimique, possèdent de nombreux inconvénients.

Tout d'abord, concernant les réticulations chimiques, elles donnent lieu à des résidus toxiques dans le collagène réticulé. Les résidus peuvent être sous forme de réactifs non consommés ou de fonctions réactives libres, issues de réactifs bifonctionnels qui n'ont réagi que par une seule extrémité.

De manière générale, ces deux types de réticulation entraînent une perte partielle ou totale de l'affinité des cellules tissulaires pour le collagène modifié.

En outre, elles ne peuvent pas être mises en oeuvre pour l'obtention d'articles moulés, à partir de solutions de collagène. En effet, aucune d'elles ne permet de maîtriser la cinétique de réticulation, pas plus que le taux de réticulation.

Dans de telles conditions aléatoires, il n'est pas possible d'envisager des fabrications industrielles simples, économiques et conduisant à des produits de qualité mécanique adaptée aux applications visées.

C'est la raison pour laquelle, dans la grande majorité des cas, les techniques de réticulation ont été utilisées limitativement sur des pièces anatomiques ou des tissus contenant du collagène.

De façon plus exceptionnelle, elles ont été mises en oeuvre pour la réticulation d'articles préformés en collagène, essentiellement des films ou des feutres.

En tout état de cause, elles demeurent inopérantes dans le large domaine restant des applications à titre de biomatériaux.

Il a été proposé, par ailleurs, d'exploiter le pontage le plus couramment rencontré sur le plan biologique, la liaison disulfure - S - S -.

L'article intitulé "Einbau von cystin-brücken in kollagen", F. SCHADE & H. ZAHN, Angew. Chem 74, 904 (1962), décrit ainsi la fixation directe d'un dérivé de la cystine sur du collagène, pour tenter d'effectuer une réticulation par pontage S - S -.

Dans ce résumé succinct de leurs travaux, les auteurs prétendent avoir obtenu du collagène réticulé par des ponts disulfures.

L'agent réticulant mis en oeuvre est un dérivé de la cystine, dans lequel les deux fonctions amines de la cystine ont été bloquées par un groupement protecteur, du genre benzyloxycarbonyl et dans lequel les deux fonctions acides de la cystine ont été activées par estérification à l'aide de nitrophénol.

Le greffage de ce dérivé de cystine sur le collagène s'opère dans un milieu neutre à base de diméthylformamide et d'eau.

Après greffage sur le collagène, les ponts disulfure ont été réduits puis réoxydés par l'oxygène de l'air (facteur d'autoréticulation) en milieu basique.

Même dans des conditions optimales théoriques, la technique de greffage direct employée ne permet d'atteindre que des taux de substitution faibles, égaux à 0,3 mM/g de collagène maximum, ce qui correspond à un greffage d'une fonction thiol, libre ou substituée, sur chaque résidu lysyl du collagène.

Dans tout le présent exposé, le taux de greffage sur le collagène est exprimé en millimoles de fonctions thiols, libres ou substituées, par gramme de collagène (mM/g).

Vingt ans après ce premier article, la demande de brevet EP 0 049 469 divulgue un pansement à base de collagène et de fibrinogène combinés. Dans ce document, on décrit l'introduction directe de fonctions thiols dans du collagène soluble extrait de tendons. Les fonctions thiols sont amenées par l'intermédiaire de la N-acétylhomocystéine thiolactone.

De la même manière que précédemment, le greffage de cette molécule sur le collagène ne peut intervenir que sur les radicaux aminés libres, portés par les résidus lysyls, ce qui équivaut à un taux de greffage maximal de 0,3 mM/g, en supposant que la réaction soit totale.

Ceci est corroboré par un article de BENESCH & BENESCH, "Proceeding of the National Academy of USA", vol. 44, 1958, p. 848-853, dans lequel le tableau I de la page 849 montre que le taux de greffage maximal en fonctions SH obtenu est de 0,295 mM/g, et cela même en présence de larges excès de thiolactone.

Force est donc de constater que ces deux techniques antérieures mettent en oeuvre des collagènes sur lesquels sont greffés directement des résidus cystéiques et offrent ainsi, théoriquement, la possibilité de réaliser des réticulations par pontages S - S. Mais ces techniques antérieures présentent l'inconvénient majeur d'imposer une limitation rédhibitoire quant au nombre de pontages S - S envisageables.

Elles n'ont donc pas débouché sur des applications biomédicales concrètes.

Aussi, dans cet état de faits, la présente invention vise à proposer un collagène modifié, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques, porteur de fonctions thiols libres ou substituées appartenant à des résidus de cystéine ou de ses dérivés. Un autre but de l'invention est de proposer un collagène modifié qui soit réticulable, c'est-à-dire apte à réticuler par formation de ponts disulfures en présence d'oxydants doux, en permettant une excellente maîtrise de la cinétique et du taux de réticulation.

Un autre but de l'invention est de fournir un collagène "thiolisé", réticulable en gels de densité de réticulation, donc de résistance mécanique, modulable à l'avance, de façon à être adaptable à divers types d'applications.

Un autre but de l'invention est de fournir un collagène, modifié, réticulable, dont la souplesse et les performances de réticulation le consacrent comme une matière première particulièrement appropriée pour l'élaboration, par exemple par moulage ou extrusion, d'articles médicaux solides, du type implants ou prothèses.

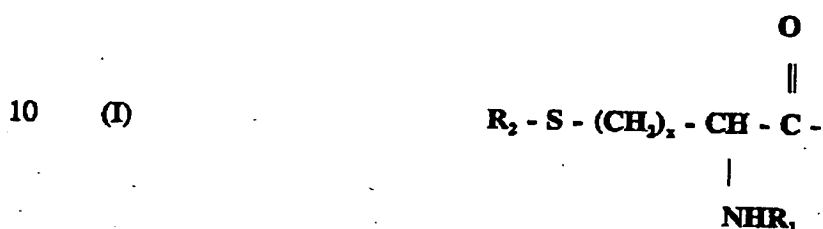
Aussi, c'est après avoir mené de nombreux essais et études que la Demanderesse est parvenue à surmonter les obstacles auxquels s'était heurté l'art antérieur et à atteindre ces buts et d'autres en fixant directement des résidus cystéiques sur le collagène, avec de forts taux de greffage.

EXPOSE DE L'INVENTION ET MEILLEURE MANIERE DE LA REALISER :

Ainsi, la présente invention concerne un nouveau collagène modifié, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques et contenant des fonctions thiols libres ou substituées, portées par des résidus de cystéine ou de

ses dérivés, lesdits résidus étant, au moins en partie, des résidus fixés directement au collagène, caractérisé en ce qu'il possède un taux de fonctions thiols supérieur à 0,3, de préférence à 0,5 millimoles (mM)/g de collagène.

Les résidus de cystéine ou de ses dérivés (ci-après indifféremment désignés sous le terme général : résidus "cystéiques"), sont directement liés au collagène par l'intermédiaire de leur(s) fonction(s) carboxylique(s) et répondent à la formule générale suivante :



dans laquelle :

- x est un nombre entier, de préférence égal à 1 ou 2, ce qui correspond, respectivement, au squelette de la cystéine et de l'homocystéine,
- R₁ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux acyles, alkyloxy-carbonyles, aryloxy-carbonyles ou aralkyloxy-carbonyles ;
- R₂ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux suivants : alkyloxy-carbonyles, aryloxy-carbonyles ou aralkyloxy-carbonyles, aralkyles, thioalkyles, thioaryles ou thioaralkyles.

Conformément à une forme préférée de mise en oeuvre de l'invention, le collagène modifié est réticulable.

Au sens de la présente invention, le terme "réticulable" désigne des collagènes modifiés, aptes à s'autoréticuler, spontanément ou moyennant une étape intermédiaire aisée à mettre en oeuvre, telle qu'une oxydation.

De façon tout à fait avantageuse, le collagène modifié réticulable suivant l'invention est aisément façonnable et manipulable industriellement. Il permet d'obtenir des articles médicaux, du type implant, prothèse ou peau artificielle, atoxiques, non immunogènes et dont les propriétés mécaniques et biologiques sont parfaitement adaptées à l'application visée.

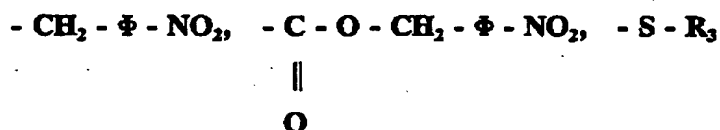
Le taux de substitution de ce collagène modifié réticulable par des

fonctions thiols libres peut varier dans une large plage de valeurs.

Ceci est particulièrement intéressant au regard de l'adaptabilité, notamment sur le plan des propriétés mécaniques, du biomatériau à diverses applications finales.

5 Ce collagène modifié peut être associé à d'autres matériaux polymères utilisables dans l'élaboration de biomatériaux.

Dans cette forme préférée de mise en oeuvre, le substituant R_2 de la formule générale du résidu cystéique est éliminable, de manière à régénérer un SH ($R_2 = H$) donnant accès à l'aptitude à la réticulation. R_2 correspond, de préférence, aux substituants suivants :

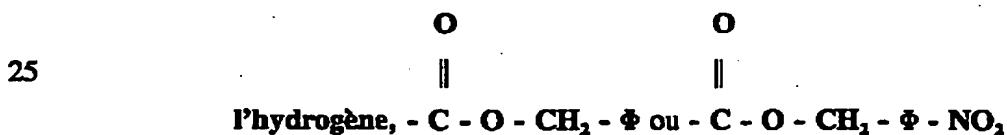


avec $R_3 = \Phi$ ou :



20 R_4 étant égal à OH, NH - coll, O - coll.

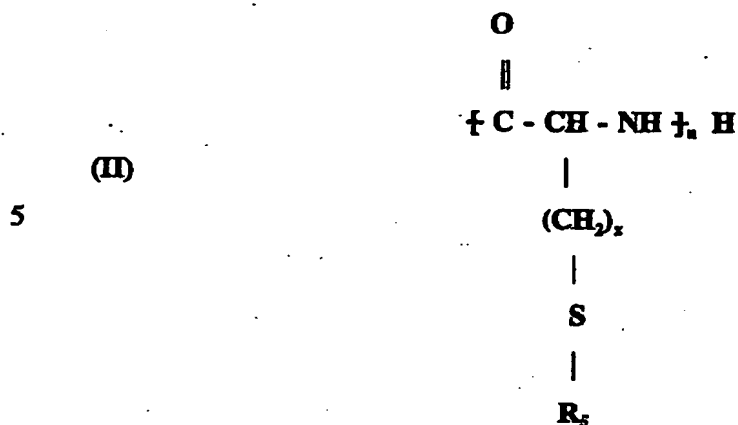
De même que précédemment, x est, de préférence, égal à 1 ou 2 (cystéine/homocystéine), et R_1 peut être constitué par les radicaux donnés ci-avant. On peut citer, en particulier :



Dans les formules ci-dessus et dans la suite du présent exposé, on désigne le radical phényle par le symbole Φ et une chaîne collagénique par l'abréviation coll.

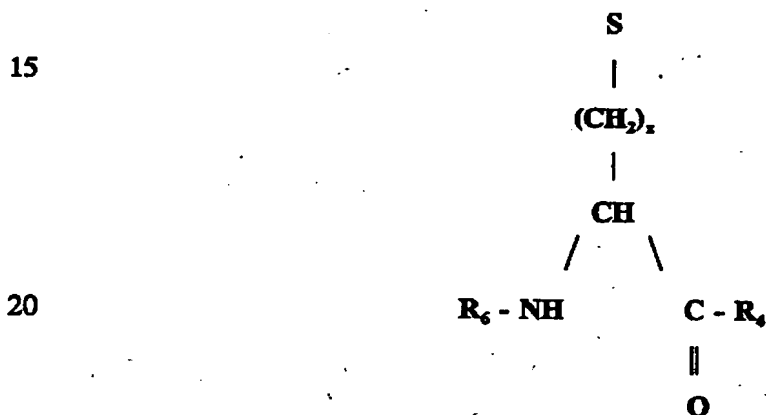
30 Suivant une variante avantageuse de l'invention, le substituant R_1 est une unité polymère de formule suivante :

10



10 dans laquelle :

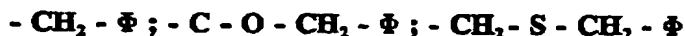
- x est tel que défini ci-dessus,
- $n \geq 2$,
- $\text{R}_5 = \text{H}, -\text{S}-\Phi$ ou :



avec $\text{R}_6 = \text{H}$ ou l'unité polymère (II) ci-dessus définie et avec $\text{R}_4 = \text{OH}, \text{NH} - \text{coll}, \text{O} - \text{coll}$. Lorsque $\text{R}_4 = \text{NH} - \text{coll}$ et/ou $\text{O} - \text{coll}$, le collagène est sous sa forme réticulée.

25 La présente invention comprend, également, des collagènes modifiés non réticulables. C'est, notamment, le cas lorsque, dans la formule générale des résidus cystéiques donnée ci-dessus, le radical R_2 correspond à l'un des substituants suivants :

30



$$\parallel$$

$$\text{O}$$

5 Le greffage direct des résidus cystéiques sur les fonctions nucléophiles (OH, NH₂) des acides aminés du collagène donne accès à des taux de substitution supérieurs à ceux obtenus jusqu'alors. Il en découle de meilleures propriétés mécaniques pour le produit réticulé obtenu à partir du collagène modifié (réticulable).

10 Le passage de ce collagène modifié à l'état réticulé s'opère aisément, par oxydation des fonctions thiols et création de ponts disulfures dans un environnement oxydant doux. Dans des conditions physiologiques in vivo, cela peut se produire par autooxydation par l'oxygène dissous ou par oxydation enzymatique, alors que, dans des conditions non physiologiques in vitro, l'oxydation peut s'effectuer à l'aide de réactifs non toxiques, tels que le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène de l'air ou l'iode.

15 Le polymère réticulé peut être obtenu très stable et possédant une grande résistance mécanique.

L'invention concerne, également, à titre de produit nouveau, un collagène réticulé, insoluble, notamment dans l'eau et/ou dans les solvants organiques, caractérisé en ce que ses pontages intercaténaires sont essentiellement
20 constitués par des ponts disulfure formés par des résidus cystéiques qui sont, au moins pour partie, des résidus cystéiques greffés directement sur le collagène, suivant un taux supérieur à 0,3, de préférence à 0,5 mM de fonctions thiols libres ou substituées par g de collagène.

25 Ce collagène réticulé peut être obtenu à partir du collagène modifié, autoréticulable décrit ci-dessus.

La présente invention concerne, par ailleurs, un procédé d'obtention d'un collagène modifié, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques et comprenant des fonctions thiols libres ou substituées, portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés, ces résidus cystéiques étant, au moins pour
30 partie, des résidus greffés directement sur le collagène.

Ce procédé constitue une possibilité, parmi d'autres, pour obtenir les

collagènes selon l'invention décrits ci-avant.

Conformément à un mode préféré de mise en oeuvre, le procédé consiste, essentiellement, à :

- placer le collagène de départ dans un solvant, en milieu homogène ou dispersif,
- 5 - protéger les fonctions thiols et amines libres du résidu cystéique mis en oeuvre,
- activer la (ou les) fonction(s) acide(s) dudit résidu.

L'originalité de ce procédé tient au fait que l'on met en oeuvre un milieu solvant ou dispersif du collagène de départ, anhydre et que l'on fait réagir les résidus protégés et activés avec le collagène de départ, en présence d'une base organique et
10 en absence d'eau, de manière à obtenir le collagène modifié visé.

Il est du mérite de la Demanderesse d'avoir mis en évidence que ces caractéristiques opératoires font partie de celles qui sont essentielles pour atteindre d'importants taux de greffage de résidus cystéiques, donc de fonctions thiols, libres ou substituées, sur le collagène.

15 En particulier, il a été découvert que la réaction du collagène avec le résidu cystéique convenablement protégé et activé par formation d'anhydride ou d'ester, en présence d'une base organique et en absence d'eau est l'un des éléments déterminants pour l'optimisation du greffage.

20 Le matériau de départ utilisé dans ce procédé peut être du collagène animal ou humain, présentant ou non des télépeptides.

Selon le mode d'activation de la (ou des) fonction(s) acide(s) retenu, il peut être avantageux, soit de solubiliser le collagène de départ dans un solvant organique anhydre, tel que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylacétamide (DMAC), le N-méthylpyrrolidone (NMP), soit de le disperser dans un milieu
25 organique anhydre, tel que le tétrahydrofurane (THF).

Dans le cas où il s'agit d'une solubilisation, elle est, de préférence, effectuée à l'aide d'un auxiliaire de solubilisation qui peut être un solvant, comme par exemple le méthanol ou un acide carboxylique.

Avantageusement, la base organique est une amine tertiaire.

30 Suivant une disposition particulièrement avantageuse de ce premier mode de mise en oeuvre du procédé de l'invention, le collagène modifié obtenu est un

précurseur d'un collagène réticulable, essentiellement par formation de ponts disulfure à partir de fonctions SH.

Dans ce cas, l'un des moyens possibles pour protéger la fonction thiol du résidu cystéique mis en oeuvre est d'introduire cette fonction thiol dans un pont disulfure. Ainsi, on utilise, de préférence, la cystine, à titre de résidu cystéique.

Suivant une variante de protection de la fonction thiol, conduisant à du collagène réticulable, on greffe sur cette fonction thiol un radical R_2 hydrocarboné sélectionné, de préférence, parmi les substituants suivants :



10



Pour obtenir cette aptitude à la réticulation, il est nécessaire que R_2 soit éliminable et transformable en SH, radical qui donne accès à la "réticulabilité".

Concernant les fonctions NH_2 , elles sont protégées par greffage d'un groupement R_1 choisi parmi les radicaux acyles, aryloxy-carbonyles, alkyloxy-carbonyles ou aralkyloxy-carbonyles, les radicaux suivants étant particulièrement préférés :



20

Les groupements benzyloxy-carbonyles sont très largement utilisés en synthèse peptidique, en particulier pour la protection des amines (voir : "The carbobenzyoxy and related groups - Chemistry of the amino acids", J. P. GREENSTEIN and M. WINITZ, 1961, 2, 887-901, édité par J. WILEY, NEW-YORK).

25

L'optimisation du greffage du résidu cystéique sur le collagène passe, également, par une activation de la (ou des) fonction(s) acide(s) de ce greffon, par exemple par formation d'anhydrides ou d'ester.

Parmi les différentes techniques d'activation par formation d'anhydride, utilisées en synthèse peptidique, la Demanderesse en a sélectionné trois convenant particulièrement bien, mais non limitativement, pour la mise en oeuvre du procédé

30

conforme à l'invention.

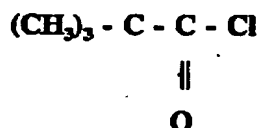
La première d'entre elles consiste à faire réagir chaque fonction acide du résidu cystéique, avec un réactif permettant d'obtenir un anhydride mixte ayant une grande affinité vis-à-vis des radicaux nucléophiles aminés et hydroxylés du collagène.

L'agent réactif utilisé est un composé de formule :

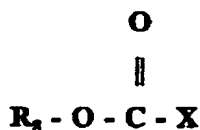


dans laquelle R_7 est un radical hydrocarboné aliphatique et/ou alicyclique et/ou aromatique, le tertibutyle étant préféré et X est un halogène, tel que le chlore.

Le chlorure de pivaloyle (triméthylacétyle) convient particulièrement bien à titre d'agent réactif :

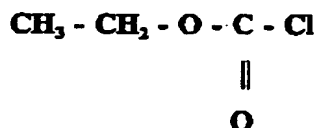


La deuxième voie d'activation de la ou des fonctions acides consiste à former des anhydrides carboniques mixtes à l'aide d'un composé de formule :



dans laquelle R_8 est un radical hydrocarboné aliphatique et/ou alicyclique et/ou aromatique, de préférence du type alkyle et, plus préférentiellement encore, éthyle et X est un halogène.

A titre d'exemple, on peut citer l'éthyl chloroformate :

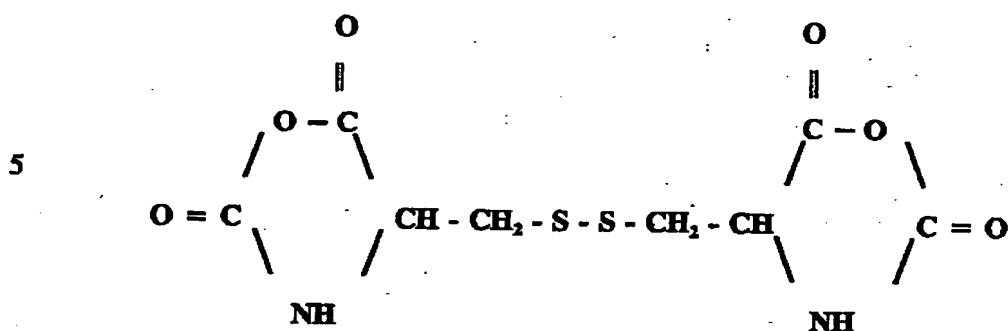


L'anhydride formé est réactif vis-à-vis des amines et des hydroxyles du collagène.

Le troisième mode d'activation est une formation de N-

carboxyanhydrides. Elle s'applique lorsque le résidu cystéique possède une (ou des) fonction(s) amine(s), protégée(s) par des radicaux N-acylalcoylé, par exemple éthyloxy, méthyloxy ou benzyloxy. L'activation est alors réalisée par transformation du (ou des) fonction(s) acide(s) du résidu en halogénure d'acide, de préférence en chlorure d'acide, réagissant ensuite avec l'(ou les) extrémité(s) N-acylalcoylé(s), selon un mécanisme de cyclisation intramoléculaire, conduisant à des anhydrides de LEUCH.

Dans le cas où le résidu cystéique est la cystine, l'anhydride de LEUCH formé a la formule suivante :



Concernant l'activation de la (des) fonction(s) acide(s) carboxylique(s) par formation d'ester, elle relève de techniques connues en synthèse peptidique, cf. :
 - "The peptides : Analysis, Synthesis and Biology", GROSS E., Meienhofer, J. Eds. Academic Press. Inc. (London), 1979,
 - "Principles of Peptide Synthesis, BODANSKY M., Springer-Verlag (Berlin), 1984.

Elle s'effectue ainsi, e. g., à l'aide d'un alcool aliphatique et/ou aromatique et/ou alicyclique et/ou hétérocyclique non aromatique.

A titre d'exemples d'alcools appropriés, on peut citer la N-hydroxybenzotriazole, la N-hydroxysuccinimide ou le p-nitrophénol, etc.

Conformément au procédé suivant l'invention, l'étape, qui suit la protection des fonctions thiol et amine et l'activation des fonctions acides du résidu cystéique, est celle où l'on fait réagir ce dernier avec le collagène de départ, éventuellement en présence d'une base organique et, de préférence, en absence

d'eau, de manière à obtenir, soit le collagène modifié visé, soit un précurseur du collagène réticulable, modifié, visé.

Les conditions générales de cette mise en réaction sont déduites des règles définies en synthèse peptidique et dépendent du type de protection et d'activation mis en oeuvre.

Plus précisément et conformément à l'une des caractéristiques essentielles du procédé suivant l'invention, cette réaction doit s'opérer en présence d'une base aminée de type tertiaire, de préférence, la triéthylamine.

Cette base augmente la nucléophilie, donc la réactivité, des amines libres des résidus lysyls du collagène.

Elle est, avantageusement, en quantité suffisante pour neutraliser les fonctions carboxyliques des résidus acides du collagène (acides aspartique et glutamique représentant environ 9 % en nombre des acides aminés du collagène), ainsi que les produits acides éventuellement formés lors du greffage.

Lorsque les résidus cystéiques ont subi une activation "anhydride" de leurs fonctions acides selon le premier ou le deuxième mode d'activation décrit ci-dessus, on les fait réagir avec du collagène solubilisé dans un milieu solvant homogène organique et anhydre.

A l'inverse, dès lors qu'ils sont activés suivant le troisième mode d'activation "anhydride", le collagène mis en oeuvre est en suspension dans un milieu anhydre dispersif et hétérogène, du type solvant organique aprotique.

Les températures et les durées de réaction sont fonction du type de résidus cystéiques mis en oeuvre (1er et 2ème mode de mise en oeuvre) et/ou du type d'activation (anhydride, ester ...) desdits résidus. L'ajustement de ces paramètres est une opération à la portée de l'homme du métier du domaine considéré.

Après réaction, les produits sont précipités, soit à l'aide d'un solvant organique, tel que l'acétate d'éthyle, l'acétone ou l'éther éthylique, lorsque l'on a à faire à une solution, soit filtrés, lorsque le milieu réactionnel est dispersif et hétérogène.

On obtient ainsi, finalement, soit un collagène modifié, soit un précurseur

de collagène SH, ce précurseur pouvant être du collagène lié à une cystine lorsque celle-ci est choisie comme résidu cystéique ou du collagène lié à un résidu cystéique dont l'extrémité soufrée est liée à un radical protecteur, par exemple du type :

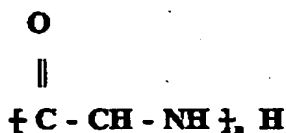


5



Dans le cadre du troisième mode d'activation "anhydride", le résidu cystéique, comprenant des N-carboxyanhydrides peut donner lieu à la formation d'un collagène modifié, sur lequel sont greffés des restes polycystéiques de formule :

10



(II)



15



Un tel collagène modifié peut lui aussi être un précurseur de collagène

20 SH.

La transformation du précurseur de collagène réticulable est obtenue par réduction à l'aide d'agents réducteurs spécifiques ou par hydrogénation catalytique, en fonction du groupement protecteur utilisé : les groupements protecteurs liés par un pont disulfure sont éliminés par réduction, les autres par hydrogénation catalytique.

25

Les agents réducteurs spécifiques sont, e. g. le β -mercaptoéthanol, l'acide mercaptoacétique, le mercaptoéthylamine, le benzylmercaptan, le thiocrésol ou bien encore le dithiothréitol.

Ils peuvent être, également, formés par un sel comme, par exemple, le borohydrure de sodium ou l'hydrogénosulfite de sodium. Les phosphines, telles que la tributylphosphine conviennent bien également à titre d'agent réducteur.

30

En pratique, on utilise, de préférence, le β -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol.

Cette étape de transformation permet de resolubiliser les collagènes qui sont ensuite dialysés contre de l'eau distillée, puis lyophilisés. Le produit final
5 obtenu est un collagène modifié contenant plus de 0,3 mM de fonctions thiols portées par les résidus cystéiques, par gramme de collagène.

Ce collagène modifié peut être soumis à une oxydation qui conduit à la formation de ponts disulfures entre les chaînes collagéniques. On obtient ainsi un réseau tridimensionnel, insoluble dans les milieux physiologiques et soluble dans des
10 milieux réducteurs capables de réduire les ponts disulfures.

Le taux de réticulation est déterminant au regard de la résistance mécanique et de la biodégradabilité des réticulats obtenus.

Les réactifs utilisés lors des modifications chimiques sont, soit transformables en produits non toxiques, soit facilement éliminables par des procédés
15 non dégradants, comme la dialyse par exemple.

Le collagène modifié sous forme réduite ne contient pas de fonctions activées résiduelles et le collagène réticulé oxydé ne peut contenir que des fonctions thiols n'ayant pas réagi. Ces fonctions ne sont pas toxiques, puisque naturellement
présentes dans un grand nombre de protéines animales.

20 Les procédés d'oxydation ne font pas appel à des substances toxiques, ni à des conditions agressives pour les tissus vivants.

L'invention offre la possibilité très appréciable de pouvoir contrôler la cinétique et le taux de réticulation du collagène.

Un autre avantage non négligeable de l'invention est qu'elle permet de
25 moduler les propriétés mécaniques en contrôlant le nombre de résidus cystéiques introduits par unité de masse du collagène.

Il faut souligner que les produits selon l'invention sont stérilisables par les méthodes classiques de stérilisation de polymères biologiques.

Il s'ensuit que les produits réticulables selon l'invention trouvent des
30 applications immédiates, d'une part, en médecine humaine et, d'autre part, dans le domaine de la biologie.

En médecine humaine, il peut s'agir d'implants, par exemple ophtalmologiques, de prothèses, par exemple osseuses, de pansements sous forme de films ou de feutres, de tissus artificiels (épiderme, vaisseaux, ligaments, os), de systèmes de bioencapsulation (microsphères, microcapsules) permettant la libération contrôlée de principes actifs in vivo, de revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables ou bien, encore, de fils de suture.

En biologie, les matériaux suivant l'invention constituent d'excellents supports pour cultures cellulaires bidimensionnelles (films) et tridimensionnelles (feutres).

Le collagène réticulé selon l'invention peut être utilisé seul ou en mélange avec des polymères biologiques modifiés ou non ou des polymères synthétiques.

Pour chacune des applications biomédicales précitées, il est indispensable de disposer d'un collagène, réticulé, possédant des propriétés physicochimiques, mécaniques ou biologiques déterminées et spécifiques. Par conséquent, il est nécessaire de maîtriser parfaitement les modifications chimiques du collagène, de manière à pouvoir produire une large gamme de collagènes réticulables et répondre ainsi, de façon satisfaisante, à la plupart des contraintes apparaissant lors de l'élaboration du cahier des charges d'une application donnée. Comme cela ressort de la description ci-dessus, l'invention répond parfaitement à cette nécessité.

D'autres avantages et variantes de la présente invention ressortent bien de l'exemple de mise en oeuvre du procédé suivant l'invention donné ci-après.

25

30

EXEMPLE**PRÉPARATION DE COLLAGÈNES MODIFIÉS, EN PARTICULIER THIOLISÉS, À L'AIDE DE CYSTINE ET PAR ACTIVATION "ANHYDRIDE" DES FONCTIONS ACIDES.**

5

A - MÉTHODOLOGIE.**1 - PRÉPARATION DU COLLAGÈNE :**

10 Le collagène utilisé dans cet exemple est de l'atélcollagène commercialisé par la Société SADUC et constitué par un mélange d'atélcollagène de type I et III extrait de peau de veau.

15 Dans le cas où l'activation des fonctions acides est obtenue par formation d'anhydrides mixtes ou d'anhydrides carboniques mixtes, le collagène est dissous dans un milieu organique polaire, aprotique et anhydre. Cela consiste, tout d'abord, à le faire gonfler dans un auxiliaire de solubilisation constitué par du méthanol (15 ml/g de collagène à dissoudre). On ajoute, ensuite, un solvant organique, à savoir le DMAC, qui permet de solubiliser le collagène, qui reste dans cet état après évaporation du méthanol sous pression réduite. Une solution concentrée, contenant jusqu'à 8 % de collagène peut ainsi être préparée.

20 Lorsque l'activation des fonctions carboxyles est réalisée par formation d'un anhydride de LEUCH, le collagène est mis en suspension dans du tétrahydrofurane.

2 - TRAITEMENT PRÉALABLE DU RÉSIDU CYSTÉIQUE :

25 Le résidu cystéique ici mis en oeuvre est la cystine. On dispose ainsi d'une protection idéale de la fonction thiol.

Il reste à procéder au masquage des fonctions amines de cette cystine.

Pour cela, on ajoute 15,3 g de benzylchloroformate en suspension dans 120 ml de soude-1-N, à 7,2 g de L-cystine dissous dans 60 ml de soude-1 N. Après trois heures sous agitation, le milieu est acidifié à pH2 à l'aide d'HCl 6N. Le précipité obtenu
30 est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique, séchée sur sulfate de sodium anhydre, est évaporée et le résidu huileux obtenu est repris dans 400 ml de

chloroforme : la N-N'-di-benzyloxycarbonyl-cystine cristallise alors progressivement sous forme de longues aiguilles.

Les fonctions acides du dérivé de cystine sont ensuite activées par mise en oeuvre de l'une des trois techniques suivantes : a, b, c.

5 **a) Activation par formation d'anhydrides mixtes :**

- Utilisation du chlorure de pivaloyle (triméthylacétyle) :

L'action du chlorure de pivaloyle sur un acide carboxylique conduit à la formation d'un anhydride mixte, très réactif vis-à-vis des amines et des alcools.

10 A 1,44 g de N,N'-di-benzyloxycarbonyl-cystine en solution dans 12 ml de THF, sont ajoutés 790 μ l (2 équivalents) de triéthylamine.

Après refroidissement du milieu à - 5° C, 698 μ l (2 équivalents) de chlorure de pivaloyle sont ajoutés. La réaction est poursuivie pendant 2 heures à - 5° C, puis 1 heure à température ambiante. Le précipité de chlorhydrate de triéthylammonium est alors filtré et le THF évaporé sous pression réduite.

15 L'huile obtenue est utilisée extemporanément telle quelle pour la réaction.

b) Activation par formation d'anhydrides carboniques mixtes :

- Utilisation de l'éthylchloroformate :

L'action de l'éthylchloroformate sur un acide carboxylique conduit à la formation d'un anhydride carbonique mixte très réactif vis-à-vis des amines et des alcools.

20 A 1,44 g de N,N'-di-benzyloxycarbonyl-cystine en solution dans 12 ml de THF sont ajoutés 790 μ l (2 équivalents) de triéthylamine.

Après refroidissement du milieu à - 10° C, 540 μ l d'éthylchloroformate (2 équivalents) sont ajoutés en trois fois. La réaction est poursuivie à cette température pendant 30 minutes, puis le chlorhydrate de triéthylammonium formé est filtré et le THF évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est utilisée extemporanément telle quelle pour la réaction.

25

c) Activation par formation d'anhydride de LEUCH :

Le chauffage d'un acide aminé N-acylalkoxylé (éthoxylé, méthoxylé, benzométhoxylé, ...), dont la fonction acide est activée sous forme d'halogénure d'acide, conduit à une cyclisation intramoléculaire, avec

30

formation d'un N-carboxyanhydride, encore appelé anhydride de **LEUCH**. Ce type de composé est réactif vis-à-vis des amines et des alcools et doit être protégé contre l'humidité.

5 La formation de l'anhydride de **LEUCH** de la cystine se déroule en deux étapes, comme indiqué ci-après.

A la N,N'-dibenzoyloxycarbonyl cystine en solution à 10 % dans le dioxane est ajouté 1,95 équivalent de PCl_5 . Après 15 minutes sous agitation avec refroidissement, le milieu réactionnel est placé à 40° C. L'anhydride de **LEUCH** de la cystine cristallise alors progressivement. La réaction est poursuivie pendant une heure, puis les cristaux sont filtrés, rincés par du dioxane et séchés sous vide.

10

3 - MISE EN RÉACTION DU RÉSIDU CYSTÉIQUE PROTÉGÉ ET ACTIVÉ AVEC LE COLLAGÈNE :

15 Le protocole est identique pour tous les résidus activés selon les techniques a, b, c énoncées ci-dessus.

Au collagène en solution dans du **DMAC** (techniques a, b)) ou en suspension dans du **THF** (technique c)), on ajoute la triéthylamine en quantité adéquate. Après 15 minutes sous agitation, les milieux sont amenés à la température de réaction et les dérivés activés de la cystine sont ajoutés. Pour chaque résidu cystine activé, les conditions exactes de mise en réaction sont indiquées dans le tableau I ci-après.

20

Après réaction, les collagènes (techniques a et b) sont précipités par de l'acétate d'éthyle, lavés par de l'acétate d'éthyle, puis rincés par de l'acétone. Pour la technique c, le collagène dispersé dans du **THF** est filtré, puis rincé par du **THF**.

25 Les collagènes modifiés obtenus sont mis en suspension dans l'eau (concentration 5 % (p/u) pour a et b, 1 % (p/u) pour c). 1 équivalent de dithiothréitol par mole de dérivé cystine introduit en réaction est ajouté aux collagènes et le pH est ajusté à 9,5 par de la soude. La réduction est poursuivie pendant 18 heures à température ambiante. Elle permet de solubiliser les collagènes.

30 Ces collagènes sont alors précipités à pH = 2 par de l'acide chlorhydrique, dialysés sous azote à pH = 3, puis lyophilisés.

TABEAU I : CONDITIONS DE MISE EN RÉACTION DES DÉRIVÉS ACTIVÉS DE LA CYSTINE AVEC LE COLLAGÈNE

Echantillons	I - Chlorure de d'allyle	II - Ethyl chloroformate	III - Anhydride de LEUCH
Collagène	1 g	1 g	1 g
Solvant	DMAc	DMAc	THF
Milieu	homogène	homogène	hétérogène
Concentration en collagène	5 % (p/v)	5 % (p/v)	5 % (p/v)
Quantité de fonctions acides activées	3 eq*/fonction substituable	3 eq*/fonction substituable	3 eq/fonction substituable
Et ₃ N	190 µl	1,12 ml	1,12 ml
Température	- 5 ° C puis retour progressif à Ta	- 10° C puis retour progressif à Ta	Refroidissement à - 75° C avant ajout de l'anhydride, puis - 35° C
Temps de réaction	20 heures	20 heures	20 heures

eq : équivalent.

* : basé sur un rendement d'activation du résidu cystéique de 100 %

Ta : température ambiante.

B - RÉSULTATS.

Les échantillons I, II, III de collagène modifié sont soumis à une analyse de leur teneur en cystéine selon la technique de dosage des SH par l'acide dithionitrobenzoïque (DTNB) décrite dans G. L. ELMANN, Arch, Biochem, Biophys, 5 1959, 82-70.

L'ajout de DTNB à une solution contenant des SH libres conduit à l'apparition d'une coloration jaune proportionnelle à la quantité de thiols présents (33). Une étape d'hydrolyse en milieu réducteur est effectuée au préalable. Elle permet la coupure 10 des ponts disulfures en SH, qui seuls sont dosés.

A 20 mg de collagène (natif ou modifié), on ajoute 1 ml de NaOH-4N-, contenant 1 % de NaBH₄. Après deux heures d'hydrolyse à 70° C, les milieux sont acidifiés par HCl-6N- jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux. Les témoins sont alors dilués au 1/500 et les échantillons au 1/200 par du tampon acétate 0,1 M, 15 pH = 5.

A 2 ml de ces solutions, on ajoute 100 µl d'une solution de DTNB 10 mM préparée dans du tampon phosphate 0,1 M pH = 7,2. L'absorption des échantillons à 410 nm est mesurée après 10 minutes d'incubation à l'obscurité. Les quantités de cystéine dans les échantillons sont calculées à partir d'une gamme étalon de cystéine (0- 20 µg/ml). 20

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

25

30

TABLEAU 2 :

Echantillons	Concentration moyenne en SH (%) *
Collagène natif	0
I	$0,64 \pm 0,05$
II	$0,41 \pm 0,02$
III	$1,59 \pm 0,46$

* = mM de fonctions SH/g de collagène.

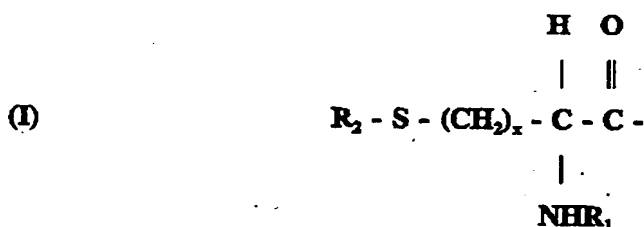
Ce tableau montre que le procédé suivant l'invention permet d'obtenir des collagènes modifiés, réticulables et contenant au moins trois résidus cystéiques pour 100 acides aminés du collagène.

REVENDECATIONS :

1 - Collagène modifié, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques et comprenant des fonctions thiols libres ou substituées, portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés, lesdits résidus étant, au moins pour partie, des résidus greffés directement sur la chaîne collagénique,

caractérisé en ce qu'il possède un taux de fonctions thiols, libres ou substituées, supérieur à 0,3, de préférence à 0,5 mM/gramme de collagène.

2 - Collagène selon la revendication 1, caractérisé en ce que les résidus cystéiques répondent à la formule générale suivante :



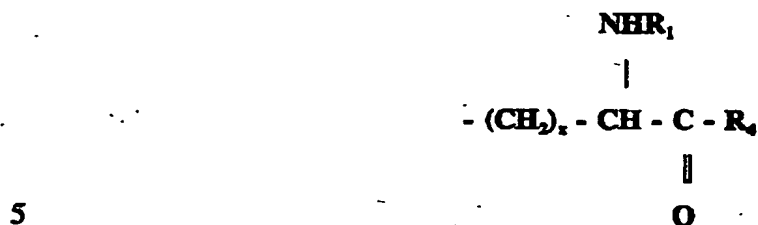
dans laquelle :

- x est un nombre entier, de préférence égal à 1 ou 2,
- R₁ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux acyles, alkyloxy-carbonyles, aryloxy-carbonyles ou aralkyloxy-carbonyles,
- R₂ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux suivants : alkyloxy-carbonyles, aryloxy-carbonyles ou aralkyloxy-carbonyles, aralkyles, thioalkyles, thioaryles ou thioaralkyles.

3 - Collagène selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est réticulable et en ce que R₂ est, de préférence, choisi parmi les substituants suivants :

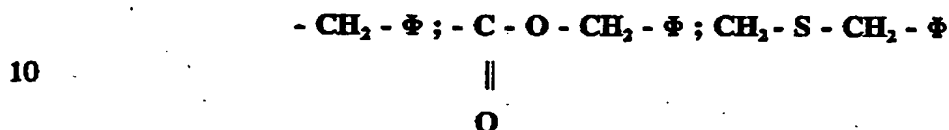


avec R₃ = Φ ou :

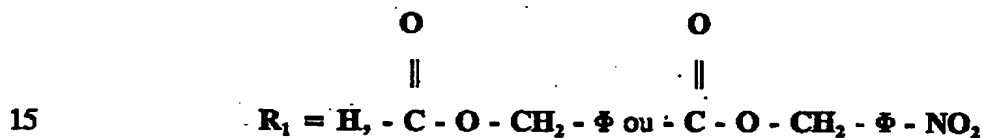


R_2 étant égal à OH, NH - coll, O - coll.

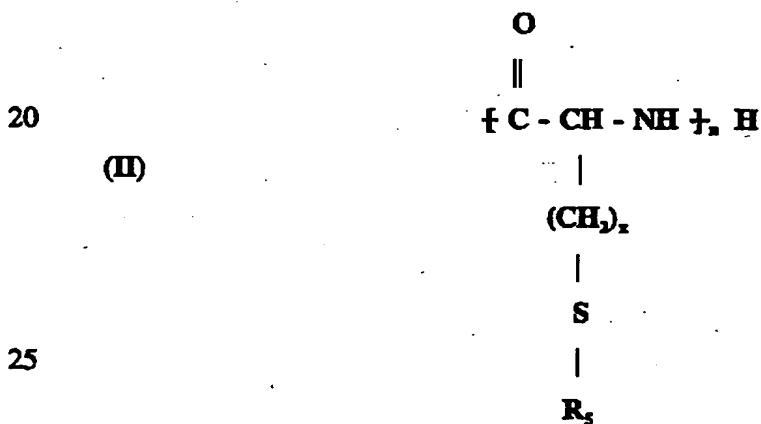
4 - Collagène selon la revendication 2, caractérisé en ce que R_2 est choisi parmi les substituants suivants :



5 - Collagène selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que :



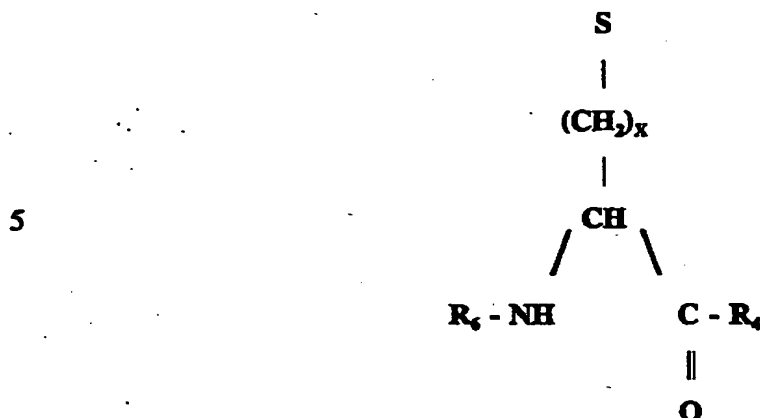
6 - Collagène selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que R_1 est une unité polymère de formule suivante :



dans laquelle :

- $n \geq 2$,

- $\text{R}_3 = \text{H} - \text{S} - \Phi$ ou :



avec $\text{R}_6 = \text{H}$ ou l'unité polymère (II) ci-dessus définie et avec $\text{R}_6 = \text{OH}$, NH - coll, O - coll.

7 - Collagène réticulé, insoluble, caractérisé en ce que ses pontages intercaténaires sont essentiellement constitués par des ponts disulfure formés par des résidus cystéiques qui sont, au moins pour partie, des résidus cystéiques greffés directement sur le collagène et présents à un taux supérieur à 0,3, de préférence à 0,5 mM de fonctions thiols libres ou substituées par gramme de collagène.

8 - Collagène selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir du collagène selon la revendication 3 et, éventuellement, l'une au moins des revendications 1, 2, 5, 6.

9 - Procédé d'obtention d'un collagène modifié, soluble dans l'eau et/ou dans les solvants organiques polaires aprotiques et comprenant des fonctions thiols libres ou substituées, portées par des résidus de cystéine ou de ses dérivés, ces résidus cystéiques étant, au moins pour partie, des résidus greffés directement sur le collagène,

ledit procédé consistant à :

- placer le collagène de départ dans un milieu solvant ou dispersif,
- protéger les fonctions thiols et amines libres du résidu cystéique mis en oeuvre,
- activer la (ou les) fonction(s) acide(s) dudit résidu,

caractérisé en ce que le milieu solvant ou dispersif du collagène de départ est anhydre et en ce que l'on fait réagir les résidus protégés et activés avec le collagène de départ, en présence d'une base organique, de préférence une amine

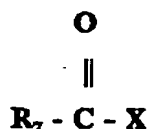
tertiaire, et en absence d'eau, de manière à obtenir le collagène modifié visé.

10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la protection des fonctions thiols est obtenue par sélection de la cystine à titre de résidu cystéique et en ce que les fonctions NH_2 sont protégées par greffage d'un groupement R_1 choisi parmi les radicaux acyles, les radicaux suivant étant particulièrement préférés :



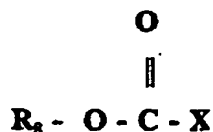
10 11 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la protection des fonctions thiols et amines libres du résidu cystéique est réalisée par formation de thiazolidine, éventuellement alkylée.

12 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que l'activation de la (ou des) fonction(s) acide(s) est réalisée par formation d'un anhydride mixte d'acide, à l'aide d'un composé de formule :



20 dans laquelle R_7 est un radical hydrocarboné aliphatique et/ou alicyclique et/ou aromatique, le tertibutyle étant préféré, et X est un halogène.

13 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que l'activation de la (ou des) fonction(s) acide(s) est réalisée par formation d'un anhydride carbonique mixte d'acide, à l'aide d'un composé de formule :



25 dans laquelle R_8 est un radical hydrocarboné aliphatique et/ou alicyclique et/ou aromatique, de préférence du type alkyle et, plus préférentiellement encore, éthyle, et X est un halogène.

14 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11,

caractérisé en ce que le résidu cystéique est N-acylalcoxylé et en ce que l'activation de la (des) fonction(s) acide(s) est réalisée par formation d'un N-carboxyanhydride, à l'aide d'un halogénure d'acide, de préférence un chlorure, réagissant avec l'(ou les) extrémité(s) N-acylalcoxylée(s) pour former un anhydride de LEUCH par cyclisation intramoléculaire.

15 15 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que l'on effectue l'activation de la (des) fonction(s) acide(s) par formation d'un ester à l'aide d'un alcool aliphatique et/ou aromatique et/ou alicyclique et/ou hétérocyclique non aromatique, tel que le N-hydroxybenzotriazole.

10 16 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 15, caractérisé en ce que le collagène modifié obtenu est un précurseur d'un collagène réticulable, essentiellement, par formation de ponts disulfure à partir de fonctions SH.

15 17 - Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le précurseur est transformé en collagène S - H par réduction, à l'aide de réducteurs spécifiques, tels que le β -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol ou par hydrogénation catalytique, ou bien encore par hydrolyse acide.

20 18 - Application du collagène modifié, réticulable, selon la revendication 3 et éventuellement l'une au moins des revendications 1, 2, 5 et 6 ou du collagène obtenu par le procédé selon la revendication 9, 11 ou 17 ou du collagène réticulé selon la revendication 7 ou 8, à la préparation d'articles utilisables en médecine, du type implants, prothèses, peaux artificielles, pansements, revêtements de prothèses ou autres.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 93/01258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C08H1/06 A61L15/00 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C08H C09H A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,3 111 512 (BENESCH ET AL.) 19 November 1963 see column 1, line 10 - line 14 see column 1, line 35 - line 44 see column 1, line 60 - line 65 see column 2, line 5 - line 10 see examples	1-3,7,8
Y	---	18
Y	EP,A,0 049 469 (DR. RUHLAND NACHF. GMBF) 14 February 1982 cited in the application see page 6, line 5 - line 23; claims --- -/--	18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 1994

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 3818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 631 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3216

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 93/01258

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ANGEW. CHEM. vol. 74, no. 22 , 1962 page 904 F. SCHADE & H. ZAHN 'Einbau von Cystin-Brücken in Kollagen' cited in the application see the whole document -----</p>	1,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 93/01258

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-3111512		NONE	
EP-A-0049469	14-04-82	DE-A- 3037513	15-04-82
		AT-T- 5373	15-12-83
		CA-A- 1167726	22-05-84
		DE-A- 3050567	05-05-83
		JP-B- 1035664	26-07-89
		JP-C- 1552101	23-03-90
		JP-A- 58041559	10-03-83
		US-A- 4407787	04-10-83